抗菌肽Sublancin对肉鸡生长性能、养分利用及盲肠菌群的影响

丁修良[1]　赵建飞[2]　王　帅[3]　于海涛[2]　曾祥芳[2]　陈红羽[2]　谯仕彦[2,4*]

（1.北京龙科方舟生物工程技术有限公司，北京 100193；2.中国农业大学动物科技学院，北京 100193；3.华中农业大学动医动科学院，武汉 4300703；4.北京生物饲料添加剂重点实验室，北京 100193）

摘　要：通过2个试验研究抗菌肽Sublancin对肉鸡生长性能、养分利用和盲肠菌群的影响。试验1：选取432只1日龄爱拔益加肉公鸡，随机分为4组(每组6个重复，每个重复18只鸡)，分别为对照组（饲喂不含抗生素的基础饲粮）、抗生素组（饲喂基础饲粮+20 mg/kg硫酸黏杆菌素）、低剂量抗菌肽组（饲喂基础饲粮+150 mg/kg Sublancin）和低剂量抗菌肽组（饲喂基础饲粮+300 mg/kg Sublancin），试验持续42 d。于试验第1天、第21天和第42天时，对肉鸡称重、结料，计算平均日采食量、平均日增重和饲料转化率；于试验第21和第42天时，每个重复随机抽取1只鸡，收集盲肠食糜用于分析盲肠菌群。试验2：选取288只1日龄爱拔益加肉公鸡，随机分成3组（每组8个重复，每个重复12只鸡），分别为对照组（饲喂不含抗生素的基础饲粮）、抗生素组（饲喂基础饲粮+80 mg/kg金霉素）和抗菌肽组（饲喂基础饲粮+300 mg/kg Sublancin），试验持续28 d。于试验第1天和第21天，对肉鸡称重、结料，计算平均日采食量、平均日增重和饲料转化率；试验第19~21天收集粪尿，测定养分表观代谢率和氮沉积；于试验第22天，每只肉鸡灌服1 mL大肠杆菌K88菌悬液（10^9 CFU/mL），第28天时每个重复选取1只鸡，收集盲肠食糜用于分析盲肠菌群。结果显示：与对照组相比，饲粮中添加300 mg/kg抗菌肽Sublancin或20 mg/kg硫酸黏杆菌素显著提高试验前期（1～21 d）、后期（22～42 d）以及全期（1～42 d）肉鸡的平均日增重和饲料转化率（P<0.05），并显著降低试验第21天和第42天肉鸡盲肠中大肠杆菌和总需氧菌数量（P<0.05）。300 mg/kg

收稿日期：2018-04-01
基金项目：国家重点研发计划（2016YFD0501308）
作者简介：丁修良（1980-），男，山东莱芜人，硕士研究生，从事抗菌肽、微生态制剂和发酵饲料研究。E-mail: dingxl@nferc.org
*通信作者：谯仕彦，教授，博士生导师，E-mail: qiaoshy@nferc.org

Sublancin组与抗生素组肉鸡的生长性能无显著差异（$P>0.05$）。与对照组相比，饲粮添加300 mg/kg抗菌肽Sublancin或80 mg/kg抗生素金霉素显著提高了粗蛋白质表观代谢率和氮沉积率（$P<0.05$）。抗菌肽组肉鸡的养分表观代谢率和氮沉积率与抗生素组没有显著差异（$P>0.05$）。抗菌肽组肉鸡的氮沉积量显著高于对照组和抗生素组（$P<0.05$）。与对照组相比，饲粮添加300 mg/kg抗菌肽Sublancin或80 mg/kg抗生素金霉素显著降低了感染大肠杆菌K88肉鸡盲肠中大肠杆菌的数量（$P<0.05$），抗菌肽组与抗生素组之间无显著差异（$P>0.05$）。由此得出，抗菌肽Sublancin用于肉鸡饲粮中抗生素替代物具有潜在的价值。饲粮中添加300 mg/kg抗菌肽Sublancin可通过提高养分利用率，减少肠道有害细菌数量来提高肉鸡的生长性能。

关键词：抗菌肽Sublancin；肉鸡；生长性能；肠道菌群；抗生素替代物

中图分类号：S816　　　　文献标识码：A　　　　文章编号：

抗生素被广泛用于动物生产已有 60 多年历史[1]。在大型养猪场和养鸡场，抗生素主要用于疾病的预防、治疗和促进生长。世界卫生组织（WHO）2012 年报道，全球被用于食用动物生产的抗生素超过抗生素总量的 50%，且其中 90%用于促生长和提高饲料转化率，给畜禽养殖业带来了显著的经济效益。但是，由于抗生素在生产实际中存在不合理以及滥用等现象，加之长期使用造成了细菌对抗生素产生耐药性或不敏感性，细菌耐药性问题导致越来越多的抗生素疗效降低甚至无效，从而对畜禽、食品安全和人类公众健康构成重大威胁[2-3]。因此，寻找传统抗生素替代物用于动物生产是迫切需要解决的任务。

抗菌肽（antimicrobial peptide,AMPs）是生物体产生的一类具有生物活性的小分子多肽，广泛地存在于生物界，是重要的天然免疫和抗感染的宿主防御肽[4-5]。抗菌肽具有广谱抗菌活性，广泛地作用于革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌、病毒和原生动物。大多数抗菌肽通过破坏细菌细胞膜的完整性发挥抗菌活性，一些抗菌肽能够穿透细胞膜并与胞内不同的靶标结合抑制细菌生长，且不易产生耐药性，因此成为抗生素替代物研究的热点[6-7]。

Sublancin 是美国马里兰大学 Hansen 研究团队从枯草芽孢杆菌 168 菌株的发酵液中分离得到一种具有抑菌活性的物质，它是由 37 个氨基酸组成并含有 2 个二硫键的阳离子肽，其性质极其稳定，可以耐受 1.5~9.5 的 pH，还可以在高温环境中稳定存在[8-10]。Sublancin 具有抗革兰氏阳性菌活性，其抗菌谱包括巨大芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、化脓性链球菌、产气夹膜梭菌等，对革兰氏阴性菌无明显抑菌效果[11-12]。Paik 等[13]认为 Sublancin 通过作用于细菌细胞膜合成的特定分子，使细胞膜形成孔洞，从而发挥其抗菌活性。Kouwen 等[14]的研究发现，Sublancin 的抑菌活性与其对细菌膜机械敏感性离子通道有关，Sublancin 可能通过抑制这种离子通道的关闭，使细菌细胞内物质快速溢出，从而使细菌裂解或死亡。Wang 等[11]研究发现，Sublancin 可能通过抑制细菌的能量代谢而抑制细菌的分裂。目前关于 Sublancin 的研究主要集中在其结构、表达调控、杀菌活性以及杀菌机制等方面。关于 Sublancin 作为饲料添加剂对肉鸡生长性能和养分利用的作用效果尚未完全阐明。因此，本试验以健康肉鸡和大肠杆菌感染肉鸡为模型，研究 Sublancin 对肉鸡生长性能、养分表观代谢率、氮沉积和盲肠菌群的影响，旨在为抗菌肽 Sublancin 作为动物生产中抗生素替代品提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 抗菌肽 Sublancin 的制备

抗菌肽 Sublancin 由国家饲料工程技术研究中心构建 1 个新型重组质粒并将其转入枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）W800 中，获得高效表达的 Sublancin，再通过 AKTA 纯化系统得到纯度高达 99.6% 的 Sublancin 冻干粉样品。其氨基酸序列为 GLGKAQCAALWLQCASGGTIGCGGGAVACQNYRQFCR，相对分子质量约为 3 879.8 u。通过抑菌活性检测冻干粉样品的活性单位，确定相应添加剂量。

1.2 试验设计与试验饲粮

本试验选用 1 日龄健康爱拔益加（AA）肉公雏为试验动物，平均初始体重为(41.90±3.21）g。试验用基础饲粮为参照我国《肉鸡饲养标准》（2004）配制的玉米-豆粕型饲粮，其组成及营养水平见表 1。所有饲粮均为粉料。

试验 1：将 432 只 1 日龄 AA 肉公雏随机分为 4 组，每组 6 个重复，每个重复 18 只鸡。对照组饲喂不含抗生素的基础饲粮，抗生素组饲喂基础饲粮+20 mg/kg 硫酸黏杆菌素，低剂量抗菌肽组饲喂基础饲粮+150 mg/kg Sublancin，高剂量抗菌肽组饲喂基础饲粮+300 mg/kg Sublancin，试验期内肉鸡自由采食和饮水，试验持续 42 d。整个饲养试验分为 2 个阶段，1~21 d 为前期，22~42 d 为后期。

试验 2：将 288 只 1 日龄 AA 肉公雏随机分为 3 组，每组 8 个重复，每个重复 12 只鸡。对照组饲喂不含抗生素的基础饲粮，抗生素组饲喂基础饲粮+80 mg/kg 金霉素，抗菌肽组饲喂基础饲粮+300 mg/kg Sublancin。Sublancin 添加剂量依据于试验 1 的结果。试验期内肉鸡自由采食和饮水，试验持续 28 d，第 1~21 天是正常饲养阶段，第 22 天进行大肠杆菌攻毒，即每只鸡灌服大肠杆菌 K88 菌悬液（10^9 CFU/mL）1 mL。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（饲喂基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of basal diets　（as-fed basis）　%

项目 Items	前期（1~21 d） Starter phase (1 to 21 d)	后期（22~42 d） Finisher phase (22 to 42 d)
原料 Ingredients		
玉米 Corn	59.28	60.72
豆粕 Soybean meal	32.40	31.60
鱼粉 Fish meal	2.00	0.00
豆油 Soybean oil	2.50	4.00
石粉 Limestone	1.27	1.15
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.52	1.60
食盐 NaCl	0.30	0.30
预混料 Premix1)	0.50	0.50
蛋氨酸羟基类似物 MHA	0.23	0.13
合计 Total	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels2)		

代谢能 Metabolizable energy/(MJ/kg)	12.56	12.98
粗蛋白质 Crude protein	21.50	19.60
钙 Calcium	1.00	0.90
有效磷 Available phosphorus	0.45	0.40
赖氨酸 Lysine	1.30	1.15
蛋氨酸 Methionine	0.65	0.50

1)预混料为每千克饲粮提供Premix provided the following per kg of diets：Zn 60 mg，Fe 95 mg，Cu 10 mg，I 0.35 mg，Se 0.3 mg，Mn 80 mg，VA 10 000 IU，VD_3 2 750 IU，VE 30 IU，VK_3 2 mg，VB_{12} 12 μg，核黄素 riboflavin 6 mg，尼克酸 nicotinic acid 40 mg，泛酸 pantothenic acid 12 mg，吡哆醇 pyridoxine 3 mg，生物素 biotin 0.2 mg，氯化胆碱 choline chloride 800 mg。

2)计算值Calculatedvalues。

1.3 饲养管理

试验鸡采用3层笼（90 cm×40 cm）平养，滴头式饮水器，自由采食和饮水，电脑控制温湿度，人工调节光照。试验前3 d 室温控制在33 ℃，随后温度每周下降3 ℃直到24 ℃恒温。24 h 光照，保持良好通风。所有肉仔鸡在试验第7天和第28天时接种新城疫疫苗，第14天和第21天时接种传染性法氏囊疫苗。试验于农业部饲料效价与安全监督检验测试中心（北京）畜禽试验基地进行，所有操作均按照中国农业大学动物福利的相关程序和要求执行。

1.4 样品采集与测定方法

1.4.1 试验1

1.4.1.1 生长性能的测定

在试验第1天、第21天和第42天，对试验鸡只进行称重，并记录耗料量，用于计算平均日采食量（average daily feed intake，ADFI）、平均日增重（average daily gain，ADG）和饲料转化率（feed conversion ratio，FCR）。

1.4.1.2 盲肠菌群的测定

于试验第21天和第42天，每个重复随机抽取1只鸡，屠宰，取盲肠食糜，纱布包好于-80 ℃速冻待测，所选鸡只体重见表2。

将盲肠食糜在常温下解冻，混匀，无菌称取盲肠食糜样品0.5 g 左右，溶解于4.5 mL 无菌生理盐水中，充分混合，然后逐级稀释至10^{-7}。选择10^{-3}~10^{-7}的稀释度，取0.1 mL 稀释液接种到厌氧滚管中进行乳酸杆菌培养；选择10^{-2}~10^{-4}的稀释度，取0.2 mL 稀释液于平板培养基中进行大肠杆菌培养；选择10^{-4}~10^{-8}的稀释度，取0.2 mL 稀释液于平板培养基中进行总需氧菌培养。所有培养基置于37 ℃培养箱中，其中乳酸菌和大肠杆菌培养24 h，总需氧菌培养48 h 后计数。每个稀释度设2个重复，选择30~300个菌落的平板或者滚管做计数用。

大肠杆菌的培养采用麦康凯琼脂培养基，培养基组成及 pH 如下：蛋白胨，20.0 g/L；乳糖，10.0 g/L；胆盐，5.0 g/L；氯化钠，5.0 g/L；中性红，0.075 g/L；琼脂，20.0 g/L；pH，7.4±0.2。乳酸杆菌的培养采用 MRS 琼脂培养基、总需氧菌的培养采用平板计数琼脂培养基，上述培养基均购自英国 OXIDE 公司。

1.4.2　试验2

1.4.2.1 生长性能的测定

在试验第1天、第21天，对试验鸡只进行称重，并记录耗料量，用于计算 ADFI、ADG 和 FCR。

1.4.2.2　养分表观代谢率与氮沉积的测定

于试验第19~21天收集粪尿，将其混匀，称重，60 ℃烘48 h，粉碎至40目用于实验室常规养分分析。饲料和粪尿样品中的干物质和粗蛋白质含量依照 AOAC（2006）的标准方法测定，总能采用氧弹式热量计（Parr 1281，美国）测定，进而计算各养分的表观代谢率。记录试验第19~21天的采食量，以及第19~21天的粪尿重，测定饲料和粪尿氮含量后计算氮沉积量和氮沉积率。

氮沉积量（g/d）=氮摄入量-粪尿氮排放量；

氮沉积率（%）=100×氮沉积量/氮摄入量。

1.4.2.3　盲肠菌群测定

于试验第28天时，每个重复随机抽取1只鸡屠宰，取盲肠食糜，纱布包好于-80 ℃速冻待测，鸡只体重见表2。盲肠中乳酸杆菌、大肠杆菌的培养和计数方法同1.4.1.2。

表 2　试验 1 与试验 2 用于盲肠菌群分析的肉鸡体重

Table 2　Body weight of broilers for cecal bacterial analysis in Exp.1 and Exp.2　g

项目 Items	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotics group	抗菌肽组 AMPs groups 150 mg/kg Sublancin	300 mg/kg Sublancin	均值标准误 SEM	*P* 值 *P*-value
试验 1 Exp.1						
第 21 天 Day 21	672^{b}	693^{a}	693^{a}	714^{a}	8.00	<0.01
第 42 天 Day 42	2 058^{c}	2 142^{b}	2 100^{a}	2 141^{b}	18.63	<0.01
试验 2 Exp.2						
第 28 天 Day 28	888^{b}	932^{a}	—	938^{a}	5.10	<0.01

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。下表同。

Values in the same row with different small letter superscripts mean significant difference （$P<0.05$）. The same as below.

1.5　统计分析

数据采用SAS 9.2的一般线性模型（GLM）中的ANOVA方法进行分析，所有指标以重复为单位。若组间存在显著差异，则用Student-Newman-Keuls test多重比较进行检验。统计结果用平均值以及均值标准误（SEM）来表示，$P<0.05$为差异显著。

2　结果与分析

2.1　试验1

2.1.1　生长性能

由表3可知，在试验前期（1～21 d），与对照组相比，饲粮添加150和300 mg/kg抗菌肽Sublancin或20 mg/kg抗生素硫酸黏杆菌素显著提高了肉鸡的ADG（$P<0.05$），并显著改善了FCR（$P<0.05$）。抗生素组和抗菌肽组肉鸡的ADG和FCR没有显著差异（$P>0.05$）。在试验后期（22～42 d），与对照组相比，饲粮添加300 mg/kg抗菌肽Sublancin显著提高了肉鸡的ADG（$P<0.05$）。与150 mg/kg Sublancin组和对照组相比，饲粮添加300 mg/kg抗菌肽Sublancin或20 mg/kg抗生素硫酸黏杆菌素显著改善了FCR（$P<0.05$）。整个试验期间（1～42 d），与对照组相比，饲粮添加300 mg/kg抗菌肽Sublancin显著提高了肉鸡的ADG（$P<0.05$），并显

著改善了FCR（$P<0.05$）。抗生素组和抗菌肽组肉鸡的ADG和FCR没有显著差异（$P>0.05$）。饲粮中添加抗菌肽Sublancin和抗生素硫酸黏杆菌素对任何阶段肉鸡的ADFI均无显著影响（$P>0.05$）。

表 3　试验 1：抗菌肽 Sublancin 对肉鸡生长性能的影响

Table 3　Effects of antimicrobial peptide Sublancin on growth performance of broilers in Exp.1

项目 Items	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotics group	抗菌肽组 AMP groups 150 mg/kg Sublancin	300 mg/kg Sublancin	均值标准误 SEM	*P* 值 *P*-value
前期 Starter phase (1~21 d)						
平均日增重 ADG/g	30^{b}	31^{a}	31^{a}	32^{a}	0.29	<0.01
平均日采食量 ADFI/g	50	51	50	51	0.31	0.38
饲料转化率 FCR	1.67^{a}	1.62^{b}	1.62^{b}	1.59^{b}	0.02	0.05
后期 Finisher phase (22~42 d)						
平均日增重 ADG/g	67^{b}	68^{ab}	67^{b}	69^{a}	0.54	<0.01
平均日采食量 ADFI/g	130	129	131	129	0.81	0.17
饲料转化率 FCR	1.94^{a}	1.88^{b}	1.94^{a}	1.87^{b}	0.02	0.02
全期 Overall phase (1~42 d)						
平均日增重 ADG/g	48^{b}	50^{a}	49^{ab}	50^{a}	0.29	<0.01
平均日采食量 ADFI/g	90	90	91	90	0.45	0.42
饲料转化率 FCR	1.86^{a}	1.80^{b}	1.84^{a}	1.78^{b}	0.01	0.02

2.1.2 盲肠菌群

由表 4 可知，与对照组相比，饲粮添加 150 和 300 mg/kg 抗菌肽 Sublancin 或 20 mg/kg 抗生素硫酸黏杆菌素显著降低试验第 21 天和第 42 天肉鸡盲肠中大肠杆菌和总需氧菌的数量（$P<0.05$）；但是，150 和 300 mg/kg Sublancin 组之间上述指标不存在显著差异（$P<0.05$）。与 150 mg/kg Sublancin 组相比，饲粮添加 20 mg/kg 抗生素硫酸黏杆菌素显著降低了试验第 21 天和第 42 天肉鸡盲肠中大肠杆菌和总需氧菌的数量（$P<0.05$）。饲粮中添加抗菌肽 Sublancin 和抗生素硫酸黏杆菌素对试验第 21 天和第 42 天肉鸡盲肠中乳酸杆菌数量无显著影响（$P>0.05$）。

表 4　试验 1：抗菌肽 Sublancin 对肉鸡盲肠菌群的影响

Table 4　Effects of antimicrobial peptide Sublancin on cecal microbiota of broilers in Exp.1　lg(CFU/g)

项目 Items	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotics group	抗菌肽组 AMPs groups		均值标准误 SEM	*P* 值 *P*-value
			150 mg/kg Sublancin	300 mg/kg Sublancin		
第 21 天 Day 21						
乳酸杆菌 *Lactobacillus*	7.21	7.39	7.33	7.60	0.23	0.82
大肠杆菌 *Escherichia coli*	4.59[a]	3.99[c]	4.33[b]	4.28[b]	0.06	0.03
总需氧菌 Total aerobic bacteria	8.95[a]	8.32[c]	8.61[b]	8.49[bc]	0.08	0.01
第 42 天 Day 42						
乳酸杆菌 *Lactobacillus*	7.35	7.51	7.41	7.61	0.20	0.91
大肠杆菌 *Escherichia coli*	4.67[a]	4.18[c]	4.35[b]	4.24[bc]	0.09	0.02
总需氧菌 Total aerobic bacteria	8.91[a]	8.40[c]	8.63[b]	8.54[b]	0.08	<0.01

2.2 试验 2

2.2.1 生长性能

由表 5 可知，与对照组相比，饲粮添加 300 mg/kg 抗菌肽 Sublancin 或 80 mg/kg 抗生素金霉素显著提高了肉鸡的 ADG，并显著改善了 FCR（$P<0.05$），但对肉鸡的 ADFI 没有显著影响（$P>0.05$）。抗菌肽组与抗生素组肉鸡的生长性能无显著差异（$P>0.05$）。

表 5 试验 2：抗菌肽 Sublancin 对肉鸡生长性能的影响

Table 5 Effects of antimicrobial peptide Sublancin on growth performance of broilers in Exp.2

项目 Items	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotics group	抗菌肽组 AMPs group	均值标准误 SEM	*P* 值 *P*-value
平均日增重 ADG/g	33^{b}	35^{a}	35^{a}	0.29	0.01
平均日采食量 ADFI/g	49	49	48	0.38	0.61
饲料转化率 FCR	1.47^{a}	1.39^{b}	1.39^{b}	0.01	<0.01

2.2.2 养分表观代谢率与氮沉积

由表 6 可知，与对照组相比，饲粮添加 300 mg/kg 抗菌肽 Sublancin 或 80 mg/kg 抗生素金霉素对干物质和能量表观代谢率没有显著影响（$P>0.05$），但显著提高了粗蛋白质表观代谢率（$P<0.05$）；抗菌肽组肉鸡的养分表观代谢率与抗生素组没有显著差异（$P>0.05$）。抗菌肽组肉鸡的氮沉积量显著高于对照组和抗生素组（$P<0.05$），达到 8.49 g/d。与对照组相比，饲粮添加 300 mg/kg 抗菌肽 Sublancin 或 80 mg/kg 抗生素金霉素显著提高了氮沉积率（$P<0.05$），但抗菌肽组与抗生素组之间没有显著差异（$P>0.05$）。

表 6　试验 2：抗菌肽 Sublancin 对肉鸡养分表观代谢率和氮沉积的影响

Table 6　Effects of antimicrobial peptide Sublancin on nutrient apparent metabolic rate and nitrogen retention of broilers in Exp.2

项目 Items	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotics group	抗菌肽组 AMPs group	均值标准误 SEM	*P* 值 *P*-value
干物质表观代谢率 Dry matter apparent metabolic rate/%	73.18	73.9	74.55	0.33	0.01
能量表观代谢率 Energy apparent metabolic rate/%	77.64	77.9	78.65	0.28	0.61
粗蛋白质表观代谢率 Crude protein apparent metabolic rate/%	64.87[b]	69.02[a]	68.95[a]	0.49	<0.01
氮沉积量 Nitrogen retention/(g/d)	7.44[c]	7.97[b]	8.49[a]	0.12	<0.01
氮沉积率 Nitrogen retention rate/%	64.87[b]	69.02[a]	68.95[a]	0.49	<0.01

2.2.3　盲肠菌群

由表 7 可知，与对照组相比，饲粮添加 300 mg/kg 抗菌肽 Sublancin 或 80 mg/kg 抗生素金霉素显著降低了感染大肠杆菌 K88 肉鸡盲肠中大肠杆菌的数量（*P*<0.05）；抗菌肽组感染大肠杆菌 K88 肉鸡盲肠中大肠杆菌数量与抗生素组无显著差异（*P*>0.05）。饲粮添加抗菌肽 Sublancin 和抗生素金霉素对感染大肠杆菌 K88 肉鸡盲肠中乳酸杆菌数量没有产生显著影响（*P*>0.05）。

表 7　试验 2：抗菌肽 sublancin 对感染大肠杆菌 K88 肉鸡盲肠菌群的影响

Table 7　Effects of antimicrobial peptide Sublancin on cecal microbiota of broilers after challenge with *Escherichia coli* K88 in Exp.2　lg(CFU/g)

项目 Items	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotics group	抗菌肽组 AMPs group	均值标准误 SEM	*P* 值 *P*-value
乳酸杆菌 *Lactobacillus*	5.87	5.63	6.24	0.11	0.08
大肠杆菌 *Escherichia coli*	4.99[a]	4.48[b]	4.36[b]	0.08	<0.01

3　讨　论

由于抗生素耐药性问题日趋严重，关于抗生素替代品的研究显得越来越重要[15]。抗菌肽因其独有的生物学特性和抗菌机制，很有潜力替代抗生素，给临床医学、药学、食品加工、农业等领域带来革命性进展[16-18]。Bals 等[19]研究显示，抗菌肽可促进动物生长，提高动物抗病能力。温刘发等[20]研究发现，在仔猪断奶料里添加抗菌肽，抗菌肽的抗腹泻效果与抗生素无显著差异，且适量的抗菌肽比抗生素的促生长效果好。陈晓生等[21]研究表明，在肉鸭饲粮中添加天蚕素 AD-酵母制剂显著增强了血清代谢激素活动，胰岛素样生长因子-1（IGF-1）浓度增高，营养物质合成加快；尿素氮浓度显著降低，体内氮排出减少，同时对免疫器官并未产生副作用。王广军等[22]的研究表明，在饲料中添加抗菌蛋白后，南美白对虾的日生长速度、相对增重率、饲料转化率、成活率和抗病力均有显著提高。由此可见，抗菌肽具有代替抗生素成为新型饲料添加剂的潜能。

本实验室前期研究发现抗菌肽 Sublancin 具有一定的体外和体内抑菌活性。给小鼠口服抗菌肽 Sublancin 后发现，抗菌肽 Sublancin 可以诱导卵清蛋白（OVA）免疫小鼠产生 Th1 和 Th2 混合型免疫反应，增强体液免疫和细胞免疫应答[23]。但是，目前关于抗菌肽 Sublancin 替代抗生素在肉鸡生产和疾病控制中的作用的报道较少。因此，本试验在已有研究工作基础上，以肉鸡为研究对象，进一步探讨抗菌肽 Sublancin 对其生长性能及肠道菌群的影响，基于以上研究结果再通过灌服大肠杆菌等应激措施，观察饲粮中添加抗菌肽 Sublancin 对肉鸡生长性能、养分利用以及肠道菌群的影响，旨在为抗菌肽 Sublancin 作为替代抗生素在饲料添加剂方面的应用提供理论依据。

硫酸黏杆菌素和金霉素曾长期作为促生长剂用于畜禽生产[17,24]，并起到了良好的效果。但由于硫酸黏菌素导致细菌耐药性的产生，农业部发布公告禁止使用。所以很多研究学者开始寻找新的替代物，本试验选择硫酸黏杆菌素和金霉素作为阳性对照的目的是研究抗菌肽 Sublancin 能否作为新型添加剂替代硫酸黏杆菌素和金霉素用于畜禽生产。本试验结果发现，饲粮中添加抗菌肽 Sublancin 能够改善肉鸡的生长性能。这一结果与王万云等[25]和卢宇等[26]的研究结果一致，即肉鸡饲粮中添加抗菌肽可显著提高生产效率。此外，Choi 等[27]的研究

发现，在肉鸡饲粮中添加合成抗菌肽-p5 提高了肉鸡的 ADG 和 FCR。本试验中还发现，饲粮中添加抗菌肽 Sublancin 对肉鸡的 ADFI 无显著影响。这一结果与 Bao 等[28]和 Ohh 等[29]的研究结果一致。本试验中，饲粮中添加抗菌肽 Sublancin 和抗生素硫酸黏杆菌素与金霉素能够同等改善肉鸡的生长性能，这表明抗菌肽 Sublancin 有潜力作为肉鸡饲粮中抗生素的替代品。这一结果与 Ohh 等[29]和 Choi 等[27]的研究结果一致。抗生素的促生长机制包括抑制病原菌、降低亚临床病原菌的侵染以及通过调控微生物组成减少肠道菌群的营养竞争[16-17,30]。在本研究中饲粮添加抗菌肽 Sublancin 提高了肉鸡的生长性能可能是由于提高了养分的吸收利用和减少肠道中有害微生物数量。

从试验 1 中我们发现饲粮添加 300 mg/kg 抗菌肽 Sublancin 显著改善了肉鸡的生长性能。在进一步研究的试验 2 中我们发现饲粮添加 300 mg/kg 抗菌肽 Sublancin 显著增加了肉鸡的氮沉积。Ohh 等[29]和 Choi 等[27,31]的研究均发现肉鸡饲粮中添加抗菌肽可提高氮沉积，进而改善生长性能。本试验中，饲粮中添加抗菌肽对干物质和能量的表观代谢率没有显著影响。这一结果与 Ohh 等[29]和 Choi 等[27,31]所得结果相似。从盲肠菌群结果发现，在正常肉鸡饲粮中添加 300 mg/kg 抗菌肽 Sublancin 或 20 mg/kg 抗生素硫酸黏杆菌素显著减少了盲肠中大肠杆菌的数量。在大肠杆菌 K88 攻毒条件下，饲粮中添加 300 mg/kg 抗菌肽 Sublancin 或 80 mg/kg 抗生素金霉素显著减少了盲肠中大肠杆菌的数量，与 Wu 等[24]的研究结果相似。由此表明，抗菌肽 Sublancin 可能具有抑制肠道内有害细菌增殖的作用，从而提高肉鸡的抗感染能力。

除了直接的抗菌作用，抗菌肽还能通过抑制微生物增殖来间接调节免疫功能，包括免疫细胞的募集，从而调节炎症反应和降低感染的程度。本实验室前期研究发现，抗菌肽 Sublancin 通过降低肠道核因子-κB（*NF-κB*）和诱导型一氧化氮合酶（*iNOS*）的表达，减轻肠道损伤，减少金黄色葡萄球菌感染小鼠的死亡率[11,30]。除此之外，本实验室前期研究还发现，抗菌肽 Sublancin 降低了小鼠回肠促炎因子白介素-1（IL-1）、白介素-6（IL-6）和肿瘤坏死因子-α（TNF-α）的水平[30]。然而，关于抗菌肽 Sublancin 是否调控了宿主的免疫功能以及对宿主盲肠菌群的影响是否与免疫功能相关有待进一步探讨。

4 结　论

抗菌肽 Sublancin 用于肉鸡饲粮中抗生素替代物具有潜在的价值。饲粮中添加 300 mg/kg 抗菌肽 Sublancin 可通过提高养分利用率，减少肠道有害细菌数量来提高肉鸡的生长性能。

参考文献：

[1] JUKES T H,STOKSTAD E L R,TAYLOE R R,et al.Growth-promoting effect of aureomycin on pigs[J].Archives of Biochemistry,1950,26(2):324–325.

[2] 杨晓燕,李辉,苏红艳.小鼠肠道菌群失调动物模型的制备[J].楚雄师范学院学报,2008,23(12):53–55.

[3] ASHIRU-OREDOPE D,HOPKINS S.Antimicrobial resistance:moving from professional engagement to public action[J].Journal of Antimicrobial Chemotherapy,2015,70(11):2927–2930.

[4] ZASLOFF M.Antimicrobial peptides of multicellular organism[J].Nature,2002,415(6870):389–395.

[5] LAI Y P,GALLO R L.AMPed up immunity:how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense[J].Trends in Immunology,2009,30(3):131–141.

[6] ZHANG L J,GALLO R L.Antimicrobial peptides[J].Current Biology,2016,26(1):R14–R19.

[7] BALTZER S A,BROWN M H.Antimicrobial peptides-promising alternatives to conventional antibiotics[J].Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology,2011,20(4):228–235.

[8] OMAN T J,BOETTCHER J M,WANG H,et al.Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide[J].Nature Chemical Biology,2011,7(2):78–80.

[9] STEPPER J,SHASTRI S,LOO T S,et al.Cysteine S-glycosylation,a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins[J].FEBS Letters,2011,585(4):645–650.

[10] JI S Y,LI W L,BALOCH A R,et al.Improved production of sublancin via introduction of three characteristic promoters into operon clusters responsible for this novel distinct glycopeptide biosynthesis[J].Microbial Cell Factories,2015,14:17.

[11] WANG Q W,ZENG X F,WANG S,et al.The bacteriocin Sublancin attenuates intestinal injury in young mice infected with *Staphylococcus aureus*[J].The Anatomical Record,2014,297(8):1454–1461.

[12] WANG G S,LI X,WANG Z.APD3:The antimicrobial peptide database as a tool for research and education[J].Nucleic Acids Research,2016,44(D1):D1087–D1093.

[13] PAIK S H,CHAKICHERLA A,HANSEN J N.Identification and characterization of the structural and transporter genes for,and the chemical and biological properties of,Sublancin 168,a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168[J].Journal of Biological Chemistry,1998,273(36):23134–23142.

[14] KOUWEN T R H M,TRIP E N,Denham E L,et al.The large mechanosensitive channel MscL determines bacterial susceptibility to the bacteriocin sublancin 168[J].Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2009,53(11):4702–4711.

[15] AMINOV R I.The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature[J].Environmental Microbiology,2009,11(12):2970–2988.

[16] YI H B,ZHANG L,GAN Z S,et al.High therapeutic efficacy of Cathelicidin-WA against postweaning diarrhea via inhibiting inflammation and enhancing epithelial barrier in the intestine[J].Scientific Reports,2016,6:25679.

[17] YU H T,DING X L,LI N,et al.Dietary supplemented antimicrobial peptide Microcin J25 improves the growth performance,apparent total tract digestibility,fecal microbiota,and intestinal barrier function of weaned pigs[J].Journal of Animal Science,95(11):5064–5076.

[18] MA Z X,KIM D,ADESOGAN A T,et al.Chitosan microparticles exert broad-spectrum antimicrobial activity against antibiotic-resistant micro-organisms without increasing resistance[J].ACS Applied Materials & Interfaces,2016,8(17):10700–10709.

[19] BALS R,WANG X R,WANG R L,et al.Mouse beta-defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs[J].Infection & Immunity,1999,67(7):3542–3547.

[20] 温刘发,张常明,付林,等.抗菌肽制剂代替抗生素在断奶仔猪饲粮中的应用效果[J].中国饲料,2001(18):13–14.

[21] 陈晓生,刘为民,周庆国,等.饲粮中添加抗菌肽对肉鸭血清代谢激素及生理生化指标的影响[J].兽药与饲料添加剂,2005,10(2):4–6.

[22] 王广军,谢俊,余德光.抗菌蛋白在南美白对虾养殖中的应用试验[J].饲料工业,2005,26(8):33–34.

[23] 张晓雅,杨青,王帅等.抗菌肽 Sublancin 增强小鼠获得性免疫的研究[J].动物营养学报,2018,30(1):236–245.

[24] WU S D,ZHANG F R,HUANG Z M,et al.Effects of the antimicrobial peptide cecropin AD on performance and intestinal health in weaned piglets challenged with *Escherichia coli*[J].Peptides,2012,35(2):225–230.

[25] 王万云,马志娟,周业飞.鸡小肠抗菌肽的提取及对肉鸡生产性能的影响[J].山西农业科

学,2010,38(7):112–114.

[26] 卢宇,王素珍,王凯民.抗菌肽S807提高肉鸡生产性能的研究[J].广东畜牧兽医科技,2010,35(4):17–20.

[27] CHOI S C,INGALE S L,KIM J S,et al.Effects of dietary supplementation with an antimicrobial peptide-P5 on growth performance,nutrient retention,excreta and intestinal microflora and intestinal morphology of broilers[J].Animal Feed Science and Technology,2013,185(1/2):78–84.

[28] BAO H,SHE R,LIU T,et al.Effects of pig antibacterial peptides on growth performance and intestine mucosal immune of broiler chickens[J].Poultry Science,2009,88(2):291–297.

[29] OHH S H,SHINDE P L,JIN Z,et al.Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) protein as an antimicrobial agent in the diets of broilers[J].Poultry Science,88(6):1227–1234.

[30] WANG S,WANG Q W,ZENG X F,et al.Use of the antimicrobial peptide sublancin with combined antibacterial and immunomodulatory activities to protect against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2107,65(39):8595–8605.

[31] CHOI S C,INGALE S L,KIM J S,et al.An antimicrobial peptide-A3:effects on growth performance,nutrient retention,intestinal and faecal microflora and intestinal morphology of broilers[J].British Poultry Science,2013,54(6):738–746.

Effects of Antimicrobial Peptide Sublancin on Growth Performance, Nutrient Utilization and Cecal Microbiota of Broilers

DING Xiuliang[1] ZHAO Jianfei[2] WANG Shuai[3] YU Haitao[2] ZENG Xiangfang[2] CHEN Hongyu[2] QIAO Shiyan[2,4*]

(1. *Beijing Longkefangzhou Bio-Engineering Tchnology Co., Ltd., Beijing* 100193, *China*; 2. *College of Animal Science and Technology*, *China Agricultural University*, *Beijing* 100193, *China*; 3. *College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070, *China*; 4. *Beijing Bio-Feed Additive Key Laboratory, Beijing* 100193, *China*)

Abstract: Two experiments were conducted to evaluate the effects of antimicrobial peptide sublancin on growth performance, nutrient utilization and cecal microbiota of broilers. In experiment 1 (Exp.1), a total of 432 one-day-old Arbor Acres male broilers were allotted to 6 groups with 6 replicates per group and 18 broilers per replicate. The broilers in control group were fed a basal diet without antibiotic, and the broilers in antibiotic group, low-dose antimicrobial peptide group and high-dose antimicrobial peptide group were fed the basal diet supplemented with 20 mg/kg colistin sulfate, 150 mg/kg sublancin and 300 mg/kg Sublancin, respectively. The Exp.1 lasted for 42 days. On the day 1, 21 and 42, the broilers were weighted and the feed intakes were counted to calculate the average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG) and feed conversion ratio (FCR); on the day 21 and 42, one broiler was selected in each replicate, and the cecal digesta were collected to analyze the cecal bacterial populations. In experiment 2 (Exp.2), a total of 288 one-day-old Arbor Acres male broilers were assigned to 3 groups with 8 replicates per group and 12 broilers per replicate. The broilers in control group were fed the basal diet without antibiotic, and the broilers in antibiotic group and antimicrobial peptide group were fed the basal diet supplemented with 80 mg/kg chlortetracycline and 300 mg/kg Sublancin, respectively. The Exp.2 lasted for 28 days. On the day 1 and 21, the broilers were weighted and

*Corresponding author, professor, E-mail: qiaoshy@nferc.org （责任编辑　菅景颖）

the feed intakes were counted to calculate the ADFI, ADG and FCR; on the day 19 to 21, feces and urine were collected to measured the nutrient apparent metabolic rate and nitrogen retention; on the day 22, each broiler administered orally 1 mL bacterial suspension of *Escherichia coli* (*E. coli*) K88 (10^9 CFU/mL), one broiler was selected in each replicate on day 28, and the cecal digesta were collected to analyze the cecal bacterial populations. The results showed as follows: compared with the control group, diet supplemented with 300 mg/kg antimicrobial peptide Sublancin or 20 mg/kg antibiotic colistin sulfate could significantly increase the ADG and FCR in starter phase (1 to 21 days), finisher phase (22 to 42 days) and overall phase (1 to 42 days) of Exp.1 (P<0.05), and could significantly decrease the populations of total aerobic bacteria and *E. coli* in cecum on day 21 and 42 (P<0.05). No significant difference was found in growth performance between 300 mg/kg Sublancin group and antibiotic group (P>0.05). Compared with the control group, diet supplemented with 300 mg/kg antimicrobial peptide Sublancin or 80 mg/kg antibiotic chlortetracycline could significantly increase the crude protein apparent metabolic rate and nitrogen retention rate (P<0.05). No significant differences were found in nutrient apparent metabolic rate and nitrogen retention rate between antimicrobial peptide group and antibiotic group (P>0.05). The nitrogen retention in antimicrobial peptide group was significantly higher than that in control group and antibiotic group (P<0.05). Compared with the control group, diet supplemented with 300 mg/kg antimicrobial peptide Sublancin or 80 mg/kg antibiotic chlortetracycline could significantly decrease the populations of cecal *E. coli* of broilers after challenge with *Escherichia coli* K88 (P<0.05), but the populations of cecal *E. coli* in antimicrobial peptide group and antibiotic group had no significant difference (P>0.05). Results from this study

suggest that antimicrobial peptide Sublancin could be used as a potential antibiotic alternative in broilers' diets. Diet supplemented with 300 mg/kg antimicrobial peptide Sublancin can enhance broilers' growth performance through increasing nutrient utilization and reducing the populations of intestinal pathogens.

Key words: antimicrobial peptide Sublancin; broilers; growth performance; intestinal microbiota; antibiotic alternative